

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Erratum

B1 Brevet n°75 39 814

Demande de brevet n°

N° de publication : 2 296 429

Classification internationale :

A61K 37/06, 35/14 ;

ERRATUM

A la rubrique 73 de la page de garde du fascicule, le nom du titulaire étant erroné,

Au lieu de : " PLASMESIO AG....."

Il faut lire : " PLASMESCO AG....."

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° d publication :

2 296 429

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 75 39814

(54)

Procédé pour améliorer la tolérance à l'injection intraveineuse de gammaglobuline.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.²).

A 61 K 37/06, 35/14.

(22)

Date de dépôt

26 décembre 1975, à 14 h 14 mn.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée en République Fédérale d'Allemagne
le 2 janvier 1975, n. P 25 00 076.4 aux noms de Waldemar Schneider et Dietrich
Wolter.*

(41)

Date de la mise à la disposition du

public de la demande

B.O.P.I. — «Listes» n. 31 du 30-7-1976.

(71)

Déposant : **RATIOPHARMA ANSTALT**, résidant dans la Principauté de Liechtenstein.

(72)

Invention de : **Waldemar Schneider et Dietrich Wolter.**

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : **Marc-Roger Hirsch, Conseil en Brevets.**

La présente invention a pour objet un procédé pour améliorer la tolérance à l'injection intraveineuse de gammaglobuline produite par précipitation à partir du sang ou de produits sanguins.

On sait que le sang est un fluide formé d'une partie liquide et d'une
5 partie solide. La partie solide est formée de globules blancs, de globules rouges et de plaquettes.

Le plasma, ou partie liquide du sang, contient environ 90% d'eau et 10% de
matières solides. Ces matières solides contiennent notamment la gammaglobuline
qui, on le sait, peut être employée pour le traitement de maladies infectieu-
10 ses et leur prophylaxie. L'isolement de ces gammaglobulines nécessite d'éli-
miner du plasma toutes les autres substances qu'il contient; ceci est en
effet la condition permettant d'obtenir une gammaglobuline pure.

Pour provoquer la précipitation et l'isolement de la gammaglobuline
contenue dans le sang, on emploie une méthode connue sous le nom de Méthode
15 COHN (cf. l'article de Cohn et al. dans la revue J. Amer. Chem. Soc. Vol 68,
pages 459-475; Vol. 72, pages 465-474).

Cette méthode connue consiste à partir d'un plasma provenant de divers
échantillons de sang et à lui faire subir une précipitation fractionnée dans
des conditions diverses. Lors de la première étape, effectuée à une température
20 de 3°C et à un pH de 7,2, on obtient, après addition d'une proportion de 8%
d'éthanol, un premier sédiment essentiellement formé de fibrinogène. Le liquide
résultant, subit alors une deuxième étape dans laquelle, à pH 5,6, il est
additionné d'une proportion de 19% d'éthanol; on obtient ainsi une nouvelle
précipitation. Le précipité ainsi obtenu contient la gammaglobuline. On
25 procède alors au traitement de purification de ce précipité, appelé fraction
Cohn II-III, par dilution puis addition, à pH 5, d'une proportion de 8%
d'éthanol, ce qui conduit à une nouvelle précipitation. La solution résultante,
après addition d'une proportion de 25% d'éthanol, à pH 7,2, donne lieu à une
nouvelle précipitation. Le précipité ainsi obtenu est alors additionné à une
30 solution tampon et, après filtration dans des conditions stériles, est dispo-
nible pour l'administration à des êtres humains.

On a constaté, dans de nombreux cas, que l'injection intraveineuse de
gammaglobuline obtenue selon des méthodes connues, conduit à une action anta-
goniste du fait de complications dues à des réactions du corps humain.

35 Aussi, a-t-on tenté d'améliorer la tolérance à l'injection par voie
intraveineuse de la gammaglobuline. Parmi les nombreuses méthodes connues, et
décrites dans la littérature médicale, on peut citer les méthodes suivantes:
qui ont conduit à une certaine amélioration de cette tolérance :

- a) le traitement de la gammaglobuline par des enzymes convenables;
- b) l'hydrolyse à des concentrations en ions hydrogène élevées (par exemple pH 4,0);
- c) la modification par action de bêta-propiolactone.

5 On a effectivement constaté que ces méthodes connues permettent de modifier les molécules de gammaglobuline et de modifier leur structure chimique de sorte que leur efficacité décroît et que leur durée de séjour moyenne dans l'organisme soit plus courte.

10 La présente invention a pour objet un procédé nouveau pour augmenter la tolérance à l'injection intraveineuse de la gammaglobuline, lequel procédé présente l'avantage d'éviter les inconvénients des procédés connus et, en outre, de conduire aux améliorations suivantes :

- les molécules de gammaglobuline employées nécessitent pratiquement pas de modification de leur structure;
- 15 - l'activité antagoniste par comparaison avec celle des préparations de gammaglobuline connues est très fortement réduite;
- la durée de séjour dans l'organisme est augmentée et le produit est mieux toléré que les produits connus.

20 Ces buts sont atteints grâce au procédé de l'invention qui consiste à augmenter la tolérance à l'injection intraveineuse de gammaglobuline, par redissolution de la gammaglobuline, préalablement obtenue par précipitation à partir du sang ou de produits sanguins, en présence de substances macromoléculaires protectrices de la molécule de globuline et qui en provoquent le déplacement, telles qu'hydroxyéthylamidon, gélatine, dextrane, albumine, 25 polyalcools, polyvinyle, en ce qu'on en provoque la précipitation, puis à nouveau la reprend dans une solution de sérum physiologique.

L'activité de l'hydroxyéthylamidon correspond présentement à un optimum; il est toutefois également possible d'obtenir une action comparable par addition des autres substances nommées.

30 Par exemple, le précipité peut être dissous dans une solution aqueuse tamponnée d'hydroxyéthylamidon dont le pH est compris entre 3,5 et 8,0. Un pH de 6,5 à 6,9 est tout particulièrement favorable pour cette opération.

La teneur en hydroxyéthylamidon dans la solution aqueuse peut être comprise entre 1 et 30%; une teneur comprise entre 8 et 10% d'hydroxyéthylamidon est tout particulièrement convenable.

35 Il est préférable, quoique non nécessaire, que le poids moléculaire de l'hydroxyéthylamidon soit compris entre 1000 et 900 000.

Après une nouvelle dilution du précipité de gammaglobuline dans la solution tamponnée d'hydroxyéthylamidon, on ajoute au mélange une proportion de 10% de polyéthylèneglycol. Le mélange contient des composants qui précipitent et des composants qui ne précipitent pas; ces derniers précipitent sous l'action du polyéthylèneglycol; on procède ensuite à une centrifugation. Au lieu de polyéthylèneglycol, il est possible d'employer pour la précipitation d'autres polyalcools sous une forme polymérisée. Le mélange est alors à nouveau centrifugé. La solution résultante est alors additionnée, à un pH de 7,0 à 7,2, d'une proportion de 20% de polyéthylèneglycol, puis est soumise à une nouvelle centrifugation. Le précipité ainsi obtenu est alors, de façon convenable, dissous dans une solution de sérum physiologique et mis en solution dans 5% d'albumine. Après filtration dans des conditions stériles, la solution obtenue est disponible pour l'administration à des êtres humains.

D'autres buts et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la description suivante et des exemples donnés à titre non limitatif.

Séparation de la gammaglobuline

On part d'un mélange de plasma, que l'on additionne de 8% d'éthanol puis qu'on laisse précipiter à un pH de 7,2 et à une température de -3°C. On provoque de cette façon la séparation de la fraction I. La solution ainsi formée est alors additionnée à -5°C et à pH 5,8, de 19% d'éthanol. On provoque de cette façon la séparation de la fraction II-III, qui est formée de gammaglobuline. Le précipité est alors à nouveau dissous et on en provoque la précipitation à pH 5 par addition de 8% d'éthanol. La solution résultante est ensuite additionnée, à pH 7,2, de 25% d'éthanol, ce qui provoque une nouvelle précipitation. Le précipité ainsi formé (fraction II) est au moins formé de 90% de gammaglobuline.

Réduction de l'activité antagoniste

Le précipité de gammaglobuline est à nouveau dissous dans une solution aqueuse tamponnée, à pH 6,7, de façon que la concentration dans la solution aqueuse soit de 6%; on ajoute alors à cette solution aqueuse une proportion de ± 10% d'hydroxyéthylamidon. L'hydroxyéthylamidon ainsi ajouté provoque la séparation des agrégats préalablement formés et, simultanément, agit à titre protecteur sur la gammaglobuline qui ne s'est pas agglomérée.

Transfert dans une solution de sérum physiologique

Après addition de 10% de polyéthylèneglycol, le mélange ainsi formé est soumis à une centrifugation. La liqueur résultante est additionnée, à pH 7,2, de 20% de polyéthylèneglycol puis subit une nouvelle centrifugation. Le précipité ainsi formé est dissous dans une solution de sérum physiologique et est amené à une concentration de 5,2% d'albumine, puis ensuite filtré dans des conditions stériles. On obtient ainsi une forme disponible pour l'administration à des êtres humains.

D'autres buts et avantages apparaîtront à la description des figures jointes, données à titre non limitatif.

La figure 1 présente la structure chimique de l'hydroxyéthylamidon;

la figure 2 présente un diagramme immuno-électrophorèse de différentes gammaglobulines et notamment de séries normales obtenues à l'aide des procédés connus et de séries obtenues à l'aide du procédé selon la présente invention.

La moitié supérieure des diagrammes présente un diagramme d'immuno-électrophorèse de séries sanguines normales tandis que la moitié inférieure du diagramme se rapporte aux substances suivantes :

- 10 a) gammaglobuline standard;
- b) gammaglobuline à modification protéolytique;
- c) gammaglobuline à modification par le bêtapropiolactone;
- d) gammaglobuline préparée selon le procédé de l'invention.

Les essais qui ont donné lieu aux diagrammes (a) à (c) se rapportent à des préparations qui se trouvent dans le commerce. Ces essais montrent qu'en plus de la ligne relative à la gammaglobuline (la ligne ayant l'aspect d'une faucille allongée à la droite du diagramme) d'autres composants albuminiques du sang humain. La ligne de la gammaglobuline dans le cas des essais (a) et (b) correspondant à la modification chimique est imprécise. Dans le cas de l'essai (c) qui correspond au cas du sérum témoin, la ligne de la gammaglobuline est déplacée par rapport à celles des essais (a) et (b).

On constate clairement, à la comparaison de ces figures, que dans le cas de l'essai (d) on ne se trouve en présence que de gammaglobuline pure car la ligne en forme de faucille du spectre se trouve être comparable à celle obtenue dans le cas du sérum normal.

De ces diagrammes, il est également possible de voir que la gammaglobuline obtenue selon le procédé de l'invention présente une pureté pratiquement de l'ordre de 100% et que la gammaglobuline est en totalité celle que contenait initialement le sérum sanguin. Ceci signifie que la molécule n'a été ni modifiée ni chimiquement changée. De ces propriétés, il résulte également un certain nombre de propriétés avantageuses de la gammaglobuline selon le nouveau procédé, à savoir la tolérance à l'injection intraveineuse de la gammaglobuline et son activité antagoniste très notablement réduite par rapport aux corps résistants, ce que l'on constate aux tests in vitro.

35 A titre d'avantages supplémentaires, il convient encore de noter qu'au stockage, la gammaglobuline ainsi obtenue présente une plus grande stabilité.

REVENDEICATIONS

1. - Procédé d'obtention d'une solution susceptible d'améliorer la tolérance à l'injection intraveineuse de gammaglobuline produite par précipitation à partir de sang ou de produits sanguins, ce procédé étant caractérisé en ce que le précipité de gamma-globuline résultant est à nouveau dilué dans une solution aqueuse en présence de substances macromoléculaires qui protègent la molécule de globuline et provoquent son déplacement, telles qu'hydroxyéthylamidon, gélatine, dextrane, albumine, polyalcools ou polyvinyle.
2. - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution aqueuse d'hydroxyéthylamidon dans laquelle la gammaglobuline précipite, est à nouveau diluée, et notamment dans une solution de sérum physiologique.
3. - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le précipité de gammaglobuline est transféré dans une solution aqueuse tamponnée à un pH compris entre 3,5 et 8 d'hydroxyéthylamidon.
4. - Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le précipité est transféré dans ladite solution d'hydroxyéthylamidon à un pH compris entre 6,5 et 6,9.
5. - Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que la teneur en hydroxyéthylamidon de la solution aqueuse est comprise entre 1 et 30% en poids.
6. - Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la teneur en hydroxyéthylamidon de la solution aqueuse est comprise entre 8 et 10% en poids.
7. - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le poids moléculaire d'hydroxyéthylamidon dans la solution est compris entre 1000 et 900 000.
8. - A titre de médicament permettant d'améliorer la tolérance à l'injection intraveineuse gammaglobuline, produite par précipitation à partir de sang ou de produits sanguins, toute solution obtenue à l'aide du procédé selon une quelconque des revendications 1 à 7.
9. - Procédé pour améliorer la tolérance à l'injection intraveineuse de gammaglobuline produite par précipitation à partir du sang ou de produits sanguins, ce procédé étant caractérisé en ce que l'on administre aux êtres humains une solution de gammaglobuline préparée à l'aide du procédé selon une quelconque des revendications 1 à 7.

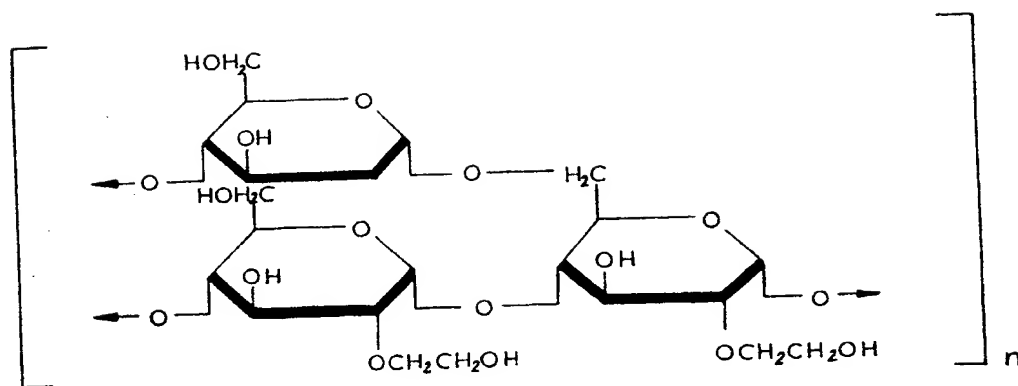


Fig. 1

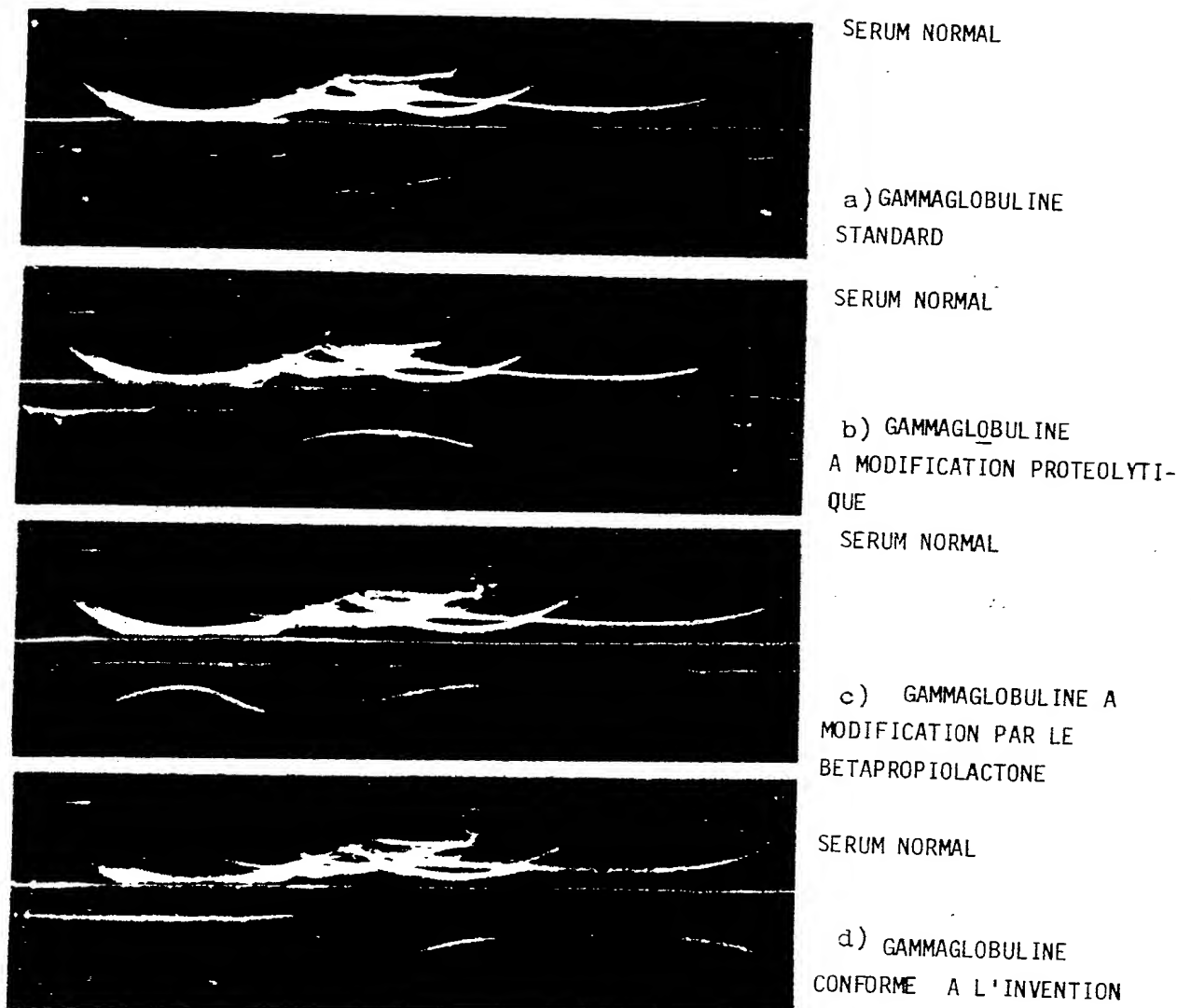


Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)